

Title	シロイヌナズナのCDC2遺伝子群の研究(Abstract_要旨)
Author(s)	今宿, 芳郎
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	1997-03-24
URL	http://hdl.handle.net/2433/202465
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

氏 名	いま じゅく よし ろう 今 宿 芳 郎
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 1841 号
学位授与の日付	平 成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	理 学 研 究 科 生 物 物 理 学 専 攻
学位論文題目	シロイヌナズナの CDC2 遺伝子群の研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 岡 穆 宏 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 柳 田 充 弘

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物において細胞分裂は、M 期、G1 期、S 期、G2 期の 4 期間から構成される細胞周期を経ることによって行われ、この細胞周期は極めて厳密に制御されている。細胞周期の制御機構は主に酵母を用いた遺伝学的解析から、34KDa のセリン・スレオニン特異的プロテインキナーゼ (*cdc2* 遺伝子産物; $p34^{cdc2}$) が、G1 から S 期への移行と G2 から M 期への移行とをチェックすることによって、細胞周期制御の中心的な役割を果たしていることが明らかにされている。植物の細胞周期制御機構は、基本的には酵母・動物における制御機構が当てはまるものと考えられるが、高等植物では受精の後、胚発生の時期までは全ての細胞が細胞分裂能を有するが、間もなくそのような能力は植物体の一部、茎頂や根端などのいわゆる分裂組織の細胞にのみ残存するようになり、動物細胞のように胚発生後も多くの組織で細胞分裂が継続するのは対照的であることから、植物に特有の細胞周期制御機構の存在も期待される。

申請論文は、植物の細胞周期制御に関する知見を得るために、モデル高等植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて、動物・酵母の細胞周期制御に中心的な役割を果たしている $p34^{cdc2}$ 遺伝子のホモログの探索を行い、それらの cDNA および遺伝子 DNA を単離し、その構造、機能、発現特異性について解析したものである。

申請者はまず、シロイヌナズナ染色体に動物・酵母 *cdc2* と類似のキナーゼ遺伝子が存在するかどうかをゲノミックサザン解析によって調べた。その結果シロイヌナズナ染色体上には *cdc2* に類似の配列が 5 個程度 (*CDC2a*, *CDC2b*, *CDC2c*, ...) 存在することを見いだした。次いで、シロイヌナズナの cDNA ライブラリーおよびゲノミックライブラリーをスクリーニングし、*CDC2a* および *CDC2b* に対応するクローンを得た。これらのクローンの構造解析から、これらの遺伝子産物は酵母・哺乳動物の $p34^{cdc2}$ と非常によく似たアミノ酸配列 (それぞれ 63%, 55% 相同) を有することがわかった。さらに分裂酵母の *cdc2* 温度感受性変異株を用いた相補性テストで、シロイヌナズナの *CDC2a* 遺伝子産物は酵母の $p34^{cdc2}$ の代わりとして働き相補性が認められたが、*CDC2b* 遺伝子産物は相補性を示さなかった。こ

これらの事実からシロイヌナズナの *CDC2a* は分裂酵母の *cdc2* と同等の機能を有し、高等植物の細胞周期制御の基本的な部分は酵母・動物と共通であることが強く示唆されるとともに、シロイヌナズナには $p34^{cdc2}$ とは異なった機能を有する *cdc2* ホモログが存在し、それらが小さな遺伝子ファミリーを形成していることも明らかになった。さらに、cDNA と遺伝子 DNA の塩基配列の比較から、*CDC2a* は 8 個のイントロンによって分断されており最初のエキソンは 5' 非翻訳領域内に存在すること、*CDC2b* は 3 個のイントロンによって分断されていること、イントロンの位置は両遺伝子で部分的に重複しているが、イントロンの長さや配列には類似性がほとんど認められないことなどが明らかになった。

次いで *CDC2a* 遺伝子の発現特異性を調べるために、*CDC2a* 転写開始領域から上流1300塩基対と下流680塩基対の領域を含む1980塩基対の DNA 断片（プロモーター領域を含むことが期待される）と GUS レポーター遺伝子とを結合してシロイヌナズナに導入し、GUS の発現位置を組織化学的に調べたところ、分裂組織で特異的に強く発現しており、*CDC2a* 遺伝子産物が実際に細胞分裂の制御に深く関わっていることが示唆された。一方、上記の1980塩基対の DNA 断片から転写開始点から下流の680塩基対（非翻訳領域の第1エキソンと第1イントロン）を欠いた DNA 断片を用いて同様の実験を行うと、もはや分裂組織での発現は認められず、この領域に分裂組織特異的な発現に関与するシス因子が含まれていることがわかる。一方、*CDC2b* のプロモーター領域を含んだ DNA を用いて同様の発現パターンの解析を行ったところ、どの組織でも GUS は非常に少量しか発現しておらず、*CDC2a* とは異なり細胞分裂制御との関連は見いだせなかった。

以上のように、申請論文は高等植物の細胞周期制御に、動物や酵母細胞と同じく $p34^{cdc2}$ が中心的な役割を果たしていることを示し、高等植物の *cdc2* 遺伝子が小さな遺伝子ファミリーを形成しており、その中には $p34^{cdc2}$ とは異なった機能を有するものがあることを明らかにした。

なお、参考論文2編は申請論文の研究成果の一部を共著者とともに公表したものである。

論文審査の結果の要旨

細胞分裂はすべての生物にみられる基本的な生命現象である。細胞が分裂・成長し、再び分裂する細胞周期は厳密に制御されている。酵母を用いた遺伝学的解析から、分子量34,000のセリン・スレオニン特異的プロテインキナーゼ（*cdc2* 遺伝子産物； $p34^{cdc2}$ ）が細胞周期制御に中心的な役割を果たしていることが明らかにされている。 $p34^{cdc2}$ は細胞周期の全期間を通じてほぼ一定量存在し、翻訳後の修飾やサイクリンなど他のタンパク質因子との複合体形成によってその活性が制御され、細胞周期の制御に寄与している。哺乳動物の細胞周期制御も酵母と同様に $p34^{cdc2}$ が主役を演じている。一方、植物の細胞周期制御の研究はこれまでほとんど皆無で僅かに生理学的な研究から、細胞周期のある特定の時期にチェックポイントが存在することが示唆される程度であった。また、高等植物では受精後の胚発生が終了すると、茎頂などの分裂組織の細胞のみに分裂能が維持され、胚発生終了後も多くの組織細胞で分裂し続ける動物の場合と対照的である。そのうえ、植物細胞は周りを細胞壁で覆われており細胞の形態を容易に変化させられないので、細胞分裂の制御そのものが植物の形態形成に深く関わっていることが想像される。したがって、植物の細胞周期制御機構は、基本的には酵母・動物における制御機構が当てはまるものと考えられるが、

植物に特有の細胞周期制御機構の存在も期待されてきた。

申請論文は、植物の細胞周期制御に関する知見を得るために、モデル高等植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて、動物・酵母の細胞周期制御に中心的な役割を果たしている $p34^{cdc2}$ 遺伝子のホモログの探索を行い、それらの cDNA および遺伝子 DNA を単離し、その構造、機能、発現特異性について解析したものである。

申請者はまず、シロイヌナズナ染色体上に分裂酵母の *cdc2* 遺伝子と類似の塩基配列が存在するか否かを、ゲノミックサザン解析、cDNA クローニングおよび遺伝子 DNA クローニングによって調べた。その結果、シロイヌナズナ染色体上には 5～6 個の *cdc2* ホモログ (*CDC2a*, *CDC2b*, *CDC2c*, ...) が存在し、その内の *CDC2a* および *CDC2b* に関しては、cDNA および遺伝子 DNA の両方をクローニングした。それぞれの遺伝子産物のアミノ酸配列は分裂酵母の $p34^{cdc2}$ とそれぞれ 63% および 55% 相同であった。これら *cdc2* の構造的ホモログが、実際に機能的ホモログでもあるか否かをテストするため、分裂酵母の *cdc2* 欠損株を用いて相補性テストを行った。その結果、*CDC2a* は酵母の *cdc2* 欠損を相補するが、*CDC2b* は相補性を示さなかった。したがって、シロイヌナズナの *CDC2a* は酵母の *cdc2* の構造的ホモログであり且つ機能的ホモログで、シロイヌナズナの細胞周期制御に働くセリン・スレオニン特異的プロテインキナーゼの構造遺伝子であると結論した。これらの実験結果は、高等植物の細胞周期制御も酵母や哺乳動物と同じく $p34^{cdc2}$ が中心的な働きをしていることを強く示唆するとともに、シロイヌナズナには *cdc2* と構造的には非常によく似ているが、その機能は *cdc2* のそれとは異なった数種類の遺伝子が存在することを明らかにした。この発見が先導役となり、他の植物種および動物においても *cdc2* 遺伝子は小さな遺伝子ファミリーを形成していることが相次いで報告され、ヒト *cdc2* ホモログの場合は、酵母の $p34^{cdc2}$ (酵母には *cdc2* 遺伝子が 1 個しか存在しない) の機能を数個の *cdc2* ホモログ遺伝子産物によって分担しており、幾つかの *cdc2* ホモログは細胞周期とは別の機能を有していることも明らかにされた。

次に *CDC2a* 遺伝子の転写開始領域から上流 1300 塩基対と下流 680 塩基対の領域を含む 1980 塩基対の DNA 断片を単離し、GUS レポーター遺伝子と融合した後、植物に導入し形質転換植物を作成し、個体内の発現領域を組織化学的に調べ、*CDC2a* は分裂組織で高頻度で発現していることを見いだした。この事実も *CDC2a* が細胞分裂の制御に関わっていることを強く示唆している。一方、上記の 1980 塩基対の DNA 断片から転写開始点から下流の 680 塩基対 (非翻訳領域の第 1 エキソンと第 1 イントロン) を欠いた DNA 断片を用いた同様の実験では、もはや分裂組織での発現は認められず、この DNA 領域に分裂組織特異的な発現に関与するシス因子が含まれていることを示した。他方、*CDC2b* はどの組織でも非常に少量しか発現していないことがわかった。

ここに得られた研究成果は、高等植物の細胞周期制御研究の最も基礎となるもので、今後のこの分野の研究の方向性を示したものと高く評価される。よって本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成 9 年 1 月 23 日、主論文および参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。